斜纹夜蛾中肠糖代谢相关基因的克隆及表达模式分析

罗婉冰，何文婧，黄玉秋，胡　丹，黄立华*，冯启理
（华南师范大学生命科学学院，广东省植物发育生物工程重点实验室，广州 510631）

摘要：斜纹夜蛾 *Spodoptera litura* 是一种世界性分布的重要农业害虫，在生长发育过程中要经历幼虫-蛹的变态发育过程。由于变态发育前后昆虫的食性发生了明显的改变，作为食物消化吸收的中肠也发生了解体和重建。与此相适应，昆虫中肠的各种物质和能量代谢也可能会相应地发生改变。为研究斜纹夜蛾中肠变态发育过程中糖代谢途径的变化情况，我们从斜纹夜蛾中肠 EST 文库中鉴定出了 12 个糖代谢相关基因，克隆了其中 3 个基因的全长 cDNA，并应用半定量 PCR 和定量 PCR 的方法检测了其在幼虫-蛹变态发育期中肠组织的转录表达以及对激素和饥饿等因素的响应情况。结果表明：这 3 个基因（α-L-岩藻糖苷酶、N-乙酰葡萄糖胺-6-磷酸去乙酰酶和烯醇化酶基因）的开放阅读框分别为 1 461，1 200 和 1 299 bp，预测的分子量分别为 56.3，43.3 和 46.7 kDa。这 12 个糖代谢相关的基因在变态发育期的中肠组织中具有 5 种不同的 mRNA 表达模式：（Ⅰ）只在幼虫期高表达（唾液麦芽糖酶前体蛋白、糖基水解酶 31 家族成员蛋白、线粒体乙醛脱氢酶、β-1,3-葡聚糖酶基因）；（Ⅱ）只在预蛹期高表达（β-葡萄糖醛酸酶、β-N-酰基氨基葡萄糖苷酶 3 基因）；（Ⅲ）只在蛹期高表达（葡萄糖胺-6-磷酸异构酶基因）；（Ⅳ）在预蛹期和蛹期高表达（α-葡萄糖苷酶、α-淀粉酶、N-乙酰葡糖胺-6-磷酸脱乙酰酶和 α-L-岩藻糖苷酶基因）；（Ⅴ）在变态发育期恒定表达（烯醇化酶基因）。这说明，为适应变态发育斜纹夜蛾中肠糖代谢途径发生了明显的改变。保幼激素对这些基因的表达没有明显的影响，但蜕皮激素对Ⅰ类基因（如糖基水解酶 31 家族成员蛋白基因）具有一定的抑制作用，对Ⅲ类基因（如葡萄糖胺-6-磷酸异构酶基因）有显著的上调作用。此外，我们还发现饥饿对几乎所有这些基因的表达都有显著的抑制作用。这些结果说明，昆虫中肠变态发育过程中糖代谢相关基因的动态变化可能受到蜕皮激素以及饥饿相关因素的共同调控。这一研究对从代谢角度揭示昆虫变态发育的分子机理具有重要意义。

关键词：斜纹夜蛾；变态发育；糖代谢；保幼激素；饥饿；基因表达；中肠
中图分类号：Q966　　**文献标识码**：A　　**文章编号**：0454-6296(2013)09-0965-09

Cloning and expression profiling of genes involved in glycometabolism in the midgut of *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae)

LUO Wan-Bing, HE Wen-Jing, HUANG Yu-Qiu, HU Dan, HUANG Li-Hua*, FENG Qi-Li
(Guangdong Key Laboratory of Biotechnology for Plant Development, South China Normal University, Guangzhou 510631, China)

Abstract: The common cutworm, *Spodoptera litura* is an important agricultural pest, which has spread out worldwide. It undergoes larval-pupal metamorphosis in the life cycle. As a major organ for food digestion and nutrient absorption, the midgut is degraded and reconstructed during the metamorphosis to adapt to the dramatic change in food type between larvae and adults. Therefore, the substances and energy metabolism in the midgut change accordingly. In order to study the sugar metabolic dynamics in the midgut during metamorphosis, twelve glycometabolism-related genes were identified from the midgut EST library of *S. litura*. Three of them were cloned to obtain their full cDNAs. The mRNA expression profiles of all the 12 genes were examined by real-time or semi- quantitative PCR in the midgut during metamorphosis, and their mRNA levels in response to the induction of hormones and starvation were also quantified. The results indicated that the open reading frames of α-L-fucoside fucohydrolase, N-acetylglucosamine-6-phosphate deacetylase and enolase genes are 1 461, 1 200 and 1 299 bp, and the

基金项目：2011 年广东省“大学生创新性实验计划项目”；国家自然科学基金项目(31172158)；国家“973”计划项目(2012CB114101)；教育部留学回国人员科研启动基金

作者简介：罗婉冰，女，1991 年生，广州人，本科生，主要从事昆虫变态发育的分子机理研究，E-mail：453637548@qq.com
* 通讯作者 Corresponding author, E-mail: huanglh@scnu.edu.cn

收稿日期 Received：2013-03-29；接受日期 Accepted：2013-07-18

predicted proteins are 56.3, 43.3 and 46.7 kDa, respectively. The mRNA expression profiles revealed five different patterns: (Ⅰ) High expression only in the larval stages, including salivary maltase precursor, glycosyl hydrolase family 31 protein, mitochondrial aldehyde dehydrogenase and β-1, 3-glucanase genes. (Ⅱ) High expression only in the prepupal stage, including β-glucuronidase and β-N-acetylglucosaminidase 3 genes. (Ⅲ) High expression only in the pupal stage, including glucosamine-6-phosphate isomerase gene. (Ⅳ) High expression both in the prepual and pupal stages, including glucosidase, α-amylase, N-acetylglucosamine-6-phosphate deacetylase and α-L-fucoside fucohydrolase genes. (Ⅴ) Stable expression, including enolase gene. This indicates that significant changes happen in glycometabolism in the midgut during metamorphosis. Juvenile hormone (JH) had no obvious effect on the mRNA level of these genes. However, 20-hydroxyecdysone (20E) suppressed the mRNA level of type I gene such as glycosyl hydrolase family 31 protein gene, and up-regulated the type Ⅲ gene (glucosamine-6-phosphate isomerase gene). In addition, the mRNA level of all the genes was significantly suppressed by starvation. The results suggest that the dynamics of mRNA level of sugar metabolic genes may be controlled by both 20E and starvation-related factor. These findings in glycometabolism will contribute to elucidating the mechanism of larval-pupal metamorphosis.

Key words: *Spodoptera litura*; metamorphosis; glycometabolism; juvenile hormone; starvation; gene expression; midgut

斜纹夜蛾 *Spodoptera litura* 属鳞翅目夜蛾科，是一种世界性分布的重要农业害虫，严重危害多种重要的经济作物，如棉花、豆类、烟草、蔬菜、水稻等，具有年发生代数多、产卵量大、世代重叠严重、寄主广、暴食性等特点（胡国栋，2003；姚文辉，2005）。

昆虫肠道中有庞大的消化系统，其中中肠是昆虫消化食物的主要场所。在糖代谢中，昆虫一般不能直接吸收食物中的多糖和寡糖，只有被分解为单糖后才能吸收。糖原转化为岩藻糖是昆虫体内岩藻糖的主要来源（Intra *et al.*, 2011），这些转化过程要依赖一系列相关的酶，如岩藻糖苷水解酶、凝集素、烯醇化酶和葡糖苷酶等。在消化前期，食物中大分子如淀粉和纤维素首先由淀粉酶、纤维素酶等降解为寡聚物。在消化中期和后期，一些双糖类物质如麦芽糖、岩藻糖和蔗糖等被昆虫体内的α-葡萄糖苷酶和β-葡萄糖苷酶水解。当双糖和多糖被水解为葡萄糖后，葡萄糖按浓度梯度从肠腔向血腔扩散，并迅速进入中肠周围的脂肪体，转化为海藻糖，从而降低血液中的葡萄糖浓度。

在这些糖代谢过程中，糖代谢酶发挥了重要作用。参与海藻糖分解代谢的酶有海藻糖酶、6-磷酸海藻糖水解酶、6-磷酸海藻糖磷酸化酶、海藻糖磷酸化酶等。糖代谢过程中存在一些限速酶，如葡萄糖激酶（glucokinase, GK）等，这些酶的活性直接调控着机体内的糖代谢。糖原的分解代谢受到细胞内糖原磷酸化酶（glycogenphosphorylase）的控制和调节，糖原磷酸化酶被称为细胞内调节糖分解代谢的限速因子。大量的研究结果表明，果糖-l, 6-二磷酸（fruetose-l, 6-diphosphate, FDP）在新陈代谢中是一种重要的调节剂，它通过激活与抑制糖代谢途径中许多酶的活性来影响糖代谢（邵友元等，1995）。而能调控这些酶表达和活性的一些因子也能通过这些限速酶影响到糖代谢，例如激素和化学试剂等。有研究表明，氟中毒能使家蚕幼虫中肠糖原磷酸化酶 a 型和 b 型的活性均明显下降，抑制了家蚕幼虫中肠组织内糖的分解代谢，使细胞的能量供应减少（吕顺霖等，1994）。Steele（1961）发现昆虫脂肪体的海藻糖合成是受激素调控的。Tian 等（2010）发现干扰蜕皮激素 20E 信号通路会显著抑制一些糖酵解通路的基因表达。除激素外，营养条件也会对糖代谢相关的基因表达产生影响（Liu *et al.*, 2009）。

斜纹夜蛾在变态发育前后的食性发生了显著的改变：幼虫期是咀嚼式口器，以植物为主要食物；变态发育后的成虫为虹吸式口器，主要取食花蜜、露珠等液体食物。中肠是昆虫食物消化吸收的主要器官。伴随变态发育的进行，幼虫的中肠解体，并重新形成成虫的中肠。在中肠变态发育过程中，其各种代谢途径必然要发生剧烈的变化以适应新的食物种类。在家蚕脂肪体中的研究表明，糖酵解相关的基因在变态发育期受到明显的抑制，而且这种抑制与蜕皮激素的高分泌有关（Tian *et al.*, 2010）。除蜕皮激素外，营养因素也可能对脂肪体糖代谢产生调控（Liu *et al.*, 2009）。在果蝇中的研究也表明，

昆虫进入变态发育期，糖酵解通路的基因几乎都受到明显的抑制（White *et al.*，1999）。变态发育过程中中肠糖代谢途径发生怎样的变化？目前几乎没有这方面的报道。在本文中，我们将以斜纹夜蛾为对象，研究中肠变态发育过程中糖代谢途径的变化，并试图探讨这种变化调控的分子机制。

1　材料与方法

1.1　试虫饲养与取样

本实验室斜纹夜蛾引种自中山大学有害生物控制与资源利用国家重点实验室，在本实验室经过多年的传代饲养（Guo *et al.*，2009；Liu *et al.*，2010）。取发育中期的 6 龄幼虫、预蛹和蛹，在冰上解剖分离中肠组织，去掉马氏管、脂肪体、围食膜以及食物残渣，并在冰冷的 PBS 缓冲液中充分洗净。所得样品迅速置于 RNA later 保护液中，在 4℃过夜，然后转移到 –20℃保存。每 3 头试虫为一取样，重复 3 次。

1.2　RNA 的提取与 cDNA 模板的制备

采用 RNeasy® Mini Kit（Qiagen Inc.，Chatsworth，CA，USA）提取样品总 RNA，并结合 DNase 消化，去除残留的痕量基因组 DNA 污染。取 1 μg 总 RNA 采用 Promega 反转录试剂盒（Madison，WI，USA）合成 cDNA。

1.3　糖代谢相关基因的鉴定和生物信息学分析

从斜纹夜蛾中肠 EST 文库（He *et al.*，2012）中鉴定出了 12 个糖代谢相关的基因。用在线软件 ORF finder（http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/gorf/）来确定完整的开放阅读框（open reading frame，ORF），并进一步用“Compute pI/Mw tool”（http://web.expasy.org/compute_pi/）预测其对应的蛋白分子量。应用 Blastn（http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi）对这些基因进行功能注释，并同时分析它们与近源基因间的最大序列相似性（Max identity）。对预测出的具有完整 ORF 的基因，我们设计了特异性引物（表 1）来扩增其 ORF，经过克隆测序获得其全长 cDNA 序列，并提交 GenBank。

1.4　不同发育阶段糖酵解相关基因的 mRNA 表达分析

采用定量 PCR（real-time quantitative PCR）和半定量 PCR（semi-quantitative PCR）的方法检测这些糖代谢相关基因在中肠组织不同发育阶段的表达情况。定量 PCR 总反应体系 20 μL，其中包括 10 μL 2×SYBR Premix EX Taq master mixture（TaKaRa，Dalian，China）、5 mmol/L 基因特异性引物（表 1）和 1 μL cDNA 模板。反应在 ABI-7300 定量 PCR 仪（Applied Biosystems，Foster City，CA，USA）上进行，PCR 反应的参数设置如下：95℃预变性 30 s，然后进行 40 个循环的 PCR 扩增（95℃，5 s；58℃，30 s；72℃，31 s），并获得熔解曲线以检验 PCR 的专一性扩增。采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$（Livak and Schmittgen，2001）计算基因的 mRNA 水平，其与内标基因 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase 基因（*gapdh*，GenBank 登录号：HQ012003）mRNA 水平的比值作为该基因 mRNA 的相对表达丰度。半定量 PCR 的方法与定量 PCR 基本一致，但 PCR 的循环数降低为 28 个。根据 PCR 产物电泳条带的亮度来确定基因表达量的相对高低。所有实验均包括 3 次生物学重复。

1.5　对激素处理的响应

参照 Gu 等（2012）的方法，选取 6 龄刚蜕皮的幼虫，分别注射 2 μg 保幼激素 JHIII（J2000，Sigma，St. Louis，MO，USA）和蜕皮激素 20E（H5142，Sigma）。另外，注射 4 μL 的 DMSO 作为阴性对照。激素处理 3，6 和 12 h 后，在冰上解剖幼虫并取中肠组织，提取总 RNA，并反转录成 cDNA，作为定量 PCR 的模板。每处理重复 3 次。

1.6　对饥饿处理的响应

采用相似的方法进行饥饿处理实验。选取刚蜕皮的 6 龄幼虫，放置于 6 孔板中，不加人工饲料，12，24 和 48 h 后取幼虫的中肠组织。刚孵出的 6 龄幼虫置于 6 孔板中，添加人工饲料继续饲养相同的时间，作为对照。提取中肠组织的总 RNA，并反转录成 cDNA，作为定量 PCR 的模板。每处理重复 3 次。

1.7　数据统计与分析

定量 PCR 数据采用 SPSS 16.0（SPSS Inc.，Chicago，IL，USA）软件进行 *t* 测验分析。数据标准误差采用平均值标准误（*SE*），以 $P<0.05$ 和 $P<0.01$ 分别作为差异显著和极显著的标准。

2　结果与分析

2.1　基因全长 cDNA 序列分析

在本研究中共获得了 3 个糖代谢相关基因的全长 cDNA 序列，它们分别为：α-L-岩藻糖苷酶（α-L-

表 1　糖代谢相关基因 PCR 扩增用引物

Table 1　Primers used in the PCR amplification of glycometabolism-related genes

EST 名称 EST name	基因产物 Gene product	引物序列(5′→3′) Primer sequence	扩增产物大小(bp) Size of PCR products	GenBank 登录号 GenBank accession no.	引物用途 Use of primers
Contig926	α-L-岩藻糖苷酶 α-L-fucoside fucohydrolase	CCGCCATATAGTGAACAGTGTC GCGTCTCCGAGGGTGCT	2 120	K832290	基因克隆 Gene cloning
Contig794	N-乙酰葡糖胺-6-磷酸脱乙酰酶 N-cetylglucosamine-6-phosphate deacetylase	AAATGAAACCTAAATCGGGCTT CGTCAAACCCCCAAAACTATTA	1 232	K832291	
Contig625	烯醇化酶 Enolase	GTATTCAAAATGCCGATCAAGT ACATACACTACAGCCAGTAATCTCTT	1 521	K832292	
Contig926	α-L-岩藻糖苷酶 α-L-fucoside fucohydrolase	CTTGGAAAGTGGCTGGCTAT GCGGATAAGTGGGGTGAGT	139	K832290	实时定量和半定量 PCR Real-time and semi-quantitative PCR
Contig794	N-乙酰葡糖胺-6-磷酸脱乙酰酶 N-acetylglucosamine-6-phosphate deacetylase	TGGTTGGTTTACTGGCTTCTA CCCAATGCGGTAGTTTCC	179	K832291	
Contig715	α-淀粉酶 α-amylase	ATACCTGACGAAGCGAACG GACCGATGACAAACTGATGC	127	KF146351	
Contig625	烯醇化酶 Enolase	CAGCAGAAGGAGATTGACGA GCCAAGTGTTTGTATAGGGGTA	149	K832292	
Contig638	β-N-乙酰基氨基葡萄糖苷酶 3 β-N-acetylglucosaminidase 3	GTTTTACATGGCAGACGGATAC TAGCAAAGTTGGCACAGTTATG	130	KF146352	
Contig381	葡萄糖胺-6-磷酸异构酶 Glucosamine-6-phosphate isomerase	GCATGTACCGCCGTCTCAT CCTCGAAACGCTTGCACTCT	228	KF146353	
Contig403	β-葡萄糖醛酸酶 β-glucuronidase	AGACCCTGGACACTTACTCACA GGTCCCAGCCTTTACCTCTT	144	KF146354	
Contig453	α-葡萄糖苷酶 α-glucosidase	TGTCGAATATGGAACCCACC TCGGCTACTCCACAGTTGTCT	129	KF146355	
Contig735	β-1, 3-葡聚糖酶 β-1, 3-glucanase	GACCTTACCCTGCGATGAA CTCCCAGAAGCCACCATTA	176	KF146356	
Contig499	唾液麦芽糖酶前体蛋白 Salivary maltase precursor	CGAAAACTTGAATGTGGCA GTATCTACCGTATCGGAAAACC	109	KF146357	
Contig657	线粒体乙醛脱氢酶 Mitochondrial aldehyde dehydrogenase	CCGTTGCGTAGCTGGTGG CTCGAATTTAAGGATGCTCTGG	139	KF146358	
Contig507	糖基水解酶 31 家族成员蛋白 Glycosyl hydrolase family 31 protein	CACAAGGAGAACCGAAAATG AGCGTTAGGGAAACCACTG	232	KF146359	
gapdh	3-磷酸甘油醛脱氢酶 Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	ACTGTTGATGGACCCTCTGGAA ACAGGAACACGGAAAGCCATAC	152	HQ012003	

fucoside fucohydrolase)基因(GenBank 登录号: K832290)、N-乙酰葡萄糖胺-6-磷酸去乙酰酶(N-acetylglucosamine-6-phosphate deacetylase)基因(GenBank 登录号: K832291)、烯醇化酶(enolase)基因(GenBank 登录号: K832292)。其中,α-L-岩藻糖苷酶基因的 ORF 全长 1 461 bp,编码 486 个氨基酸,预测的分子量为 56.3 kDa(图 1: A)。该基因与熊蜂 *Bombus terrestris* 和蜜蜂 *Apis mellifera* 的 α-L-岩藻糖苷酶基因均具有最高的序列一致性(68%)。该酶属于29个糖基水解酶家族之一,主

A

```
1     ATGAGATTGCTAATATTTTCAATATTTATCTGCTTAGCATATGCTAAGATACGAGAAATTAGTGTATTCAAATCG
1     M R L L I F S I F I C L A Y A K I R E I S V F K S
76    GAAAATAATGTTCTGGATACGGGTTTCAATGATGGAAAGGGATATCGACCGAATTGGAGGGATTTGGATAAACGG
26    E N N V L D T G F N D G K G Y R P N W R D L D K R
151   CCGCTACCCGAGTGGTATGATAGAGCTAAGATAGGCATATTCCTCCATTGGGGGTGTATGCCGTACCTAGTTTC
51    P L P E W Y D R A K I G I F L H W G V Y A V P S F
226   GGGTCGGAATGGTTTTGGATGAACTGGAAAACTAATGTGACAAAATACGTTAACTTCATGGATAAAAATTATCCA
76    G S E W F W M N W K T N V T K Y V N F M D K N Y P
301   CCAAATTTTACGTATCAGCAATTTGCTCCCATGTTTACGGCAGAATTTTTCGACCCTGCAGCATGGGCACAATTA
101   P N F T Y Q Q F A P M F T A E F F D P A A W A Q L
376   TTTGCGGAAGCTGGAGCGAAGTACCTTGTCTTAACTAGCAAACATCATGAAGGTTTCACCTTGTTCCCATCAAAG
126   F A E A G A K Y L V L T S K H H E G F T L F P S K
451   CGTTCATTTAGTTGGAATGCAGTTGATGTCGGGCCAAAACGAGACTTGGTGGGCGAGCTATCGGCTGCTGTAAGA
151   R S F S W N A V D V G P K R D L V G E L S A A V R
526   AAGAGGGGTCTAAAGTTTGGTGTATATCATTCTTTGTATGAATGGTTCAACCCAATCTACCTGCAGGATAGAAAT
176   K R G L K F G V Y H S L Y E W F N P I Y L Q D R N
601   GCATCATTTGAGACACACACATTTGTAGACACAAAGTTGTGGCCTGATTTAAAACAAATTATCCATGATTATAAA
201   A S F E T H T F V D T K L W P D L K Q I I H D Y K
676   CCATCAGTGATTTGGTCTGATGGTGATTGGGAAGCTCCTGATGATTACTGGAGGTCCACAGACCTTTTGGCTTGG
226   P S V I W S D G D W E A P D D Y W R S T D L L A W
751   CTGTACAACAATAGTCCAGTTAGAGAAGAAGTTGTAGTAAATGATAGATGGGGTAAAGATATCCCTGGACATCAC
251   L Y N N S P V R E E V V V N D R W G K D I P G H H
826   GGAGACTTCTTTAATCATGCTGATAGATTCAATCCTGGTAAACTACTCGACCATAAATGGGAAAACGCTTTTACA
276   G D F F N H A D R F N P G K L L D H K W E N A F T
901   GTTGATAAAGTATCATGGGGATACAGAAGAAATATGAAAATCGGTGAAATAATGTCAGATTCACAGCTTCTGTTC
301   V D K V S W G Y R R N M K I G E I M S D S Q L L F
976   CAAGTAGTATCAACAGTCAGTTGTGGAGGGAACGCCCTTATCAATGTGGGTCCCACTAAGGAAGGGACAATAATA
326   Q V V S T V S C G G N A L I N V G P T K E G T I I
1051  CCAGTATTTCAAGAACGACTTTTATTCCTTGGAAAGTGGCTGGCTATCAATGGAGAAGCGATATATGACAGCTCA
351   P V F Q E R L L F L G K W L A I N G E A I Y D S S
1126  CCATGGTTCTCCCAAAACGACACAGTGAATGGCAAAGTATGGTACACTTGTACAAAAGAAAATTATAATGCTACT
376   P W F S Q N D T V N G K V W Y T C T K E N Y N A T
1201  CACCCCACTTATCCGCCTACTGCTAATGATAAAATTCTTGCAATCTATGCTATTGCGCTTGAATGGCCTAAGGAC
401   H P T Y P P T A N D K I L A I Y A I A L E W P K D
1276  AATTGGTTAACTCTTGGCGATATTACAAGTTATTTGCACAGAGGGACTTATCAAGTGGAGTTGTTGGGAAACAAA
426   N W L T L G D I T S Y L H R G T Y Q V E L L G N K
1351  GGAGTGTACTTGACTTGGAAGATAAGTAACGGGAAGGTCGCTATACAACTGCCCGATAAGGCGACTGTGCGCTCG
451   G V Y L T W K I S N G K V A I Q L P D K A T V R S
1426  AAAGTAGCTTGGACTTTAAAGTTTACGTTGAAGTAA
476   K V A W T L K F T L K *
```

B

```
1     ATGAAACCTAAATCGGGCTTAACGAGATTTTATAACTGTTTTATTTTACGTGATAGTAAAATAATTAAAGAAGAC
1     M K P K S G L T R F Y N C F I L R D S K I I K E D
76    TTATGGATAAGAGACGGCAAAATCGAAAATCCTGAACAGGTATTTTATGTAGAACAACTACAGGCCGATGTAACT
26    L W I R D G K I E N P E Q V F Y V E Q L Q A D V T
151   GTAAACTGCGAAGGACTGCTCATTGCTCCAGGGTTCATTGACATTCAGATAAACGGTGGTTGGGGTGTGGACTTC
51    V N C E G L L I A P G F I D I Q I N G G W G V D F
226   TCCTATGATTCAGAAAATGTTAAAGAAGGTGTAAGGAAAGTATCAAAAGAACTTTTGACTCATGGAGTTACATCA
76    S Y D S E N V K E G V R K V S K E L L T H G V T S
301   TTTTGTCCTACAATGGTGACATCAGATTTGGAAAAGTACCGTAAAATCCTACCTTTGATAAAGAAGTCTGATGGT
101   F C P T M V T S D L E K Y R K I L P L I K K S D G
376   GGTGAGCATGGAGCCACTGTTTTGGGAGTGCATTTAGAGGGTCCATTTATCAATATGGCTAAAAAGGGTGCTCAT
126   G E H G A T V L G V H L E G P F I N M A K K G A H
451   ATGGAGGAGTACATCAAAACACCTGATGAGGGTTTAAAGACTGTGGAAGAAGTCTATGGATCATTAGATAATGTT
151   M E E Y I K T P D E G L K T V E E V Y G S L D N V
526   GTTATTGTAACATTGGCCCCAGAGTTGCCAGGTGCTCATGAAGCAATCAAAGACCTTACTGAGATGGGTATCAAA
176   V I V T L A P E L P G A H E A I K D L T E M G I K
601   GTAGCACTGGGGCATTCCACTGCCAGCTTAGCCGAGGGAGAAAAGGCTGTTGAATGTGGTGCTAATCTGATCACA
201   V A L G H S T A S L A E G E K A V E C G A N L I T
676   CACTTGTTCAATGCTATGCTTCCTTTCCATCACCGCGATCCTGGACTGGTTGGTTTACTGGCTTCTACTACGAAA
226   H L F N A M L P F H H R D P G L V G L L A S T T K
751   CACCAGGTTTTCTATGGCATTATATCAGATGGGATCCACACTCATCCAGCTGCTTTACGAATTGCAAGCAGAACT
251   H Q V F Y G I I S D G I H T H P A A L R I A S R T
826   AATCCTGAAGGCTTGGTGCTTGTTAGTGACGCGGTGGCTGCTCAGGGTCTCGCCGACGGAAACTACCGCATTGGG
276   N P E G L V L V S D A V A A Q G L A D G N Y R I G
901   CCACAGCTCGTCACAGTGGAGGGTGGGCGTGCTTACGTGGCTGGAACTAAAGTACTCTGTGGCAGCACCACTGGC
301   P Q L V T V E G G R A Y V A G T K V L C G S T T G
976   CTAGACGACTGTGTCGCCACATTGAAACGATCTTTGGATTGCTCCTTGGAATATGCATTGGAAGCAGCGTCCCTC
326   L D D C V A T L K R S L D C S L E Y A L E A A S L
1051  CACCCAGCTAGAGCTTTAGGCATCGATGACAGGAAAGGAAAACTTAATTTCGGGTTTGATGCAGACTTCGTTATG
351   H P A R A L G I D D R K G K L N F G F D A D F V M
1126  CTTGACCCAGAAAAAATCAAAATCAAGTCCACTTGGATTGCAGGAGAATGTGTTTATAAATGTGATAGAAACTGA
376   L D P E K I K I K S T W I A G E C V Y K C D R N *
```

C

```
1     ATGCCGATCAAGTCAATCAAGGCCCGTCAAATCTTCGACTCCCGTGGCAACCCCACTGTGGAGGTTGATCTGGTG
1     M P I K S I K A R Q I F D S R G N P T V E V D L V
76    ACAGAGCTAGGCCTTTTCCGTGCGGCTGTACCATCTGGCGCATCTACTGGTGTCCATGAGGCTTTAGAGCTCAGA
26    T E L G L F R A A V P S G A S T G V H E A L E L R
151   GACAATGTGAAGGGAGAGTACCATGGCAAGGGTGTCCTCACTGCCATCAAGAACATCAATGACATCATTGCTCCT
51    D N V K G E Y H G K G V L T A I K N I N D I I A P
226   GAGCTTCTCAAACAAAACCTTGAGGTCACACAGCAGAAGGAGATTGACGACTTTATGCTGAAGTTGGATGGCACT
76    E L L K Q N L E V T Q Q K E I D D F M L K L D G T
301   GAAAACAAGTCAAAGTTGGGTGCCAATGCCATCCTTGGTGTATCTTTGGCAGTTGCCAAGGCTGGTGCTGCAAAG
101   E N K S K L G A N A I L G V S L A V A K A G A A K
376   AAGGGAGTACCCCTATACAAACACTTGGCTGACTTAGCTGGAAATGCTGATATTGTACTTCCAGTACCAGCATTC
126   K G V P L Y K H L A D L A G N A D I V L P V P A F
451   AACGTCATCAACGGAGGCTCCCATGCCGGCAACAAGCTTGCTATGCAGGAGTTCATGATCTTACCCACAGGTGCT
151   N V I N G G S H A G N K L A M Q E F M I L P T G A
526   TCCTCATTCAGTGAGGCAATGCGTATGGGATCAGAAGTGTACCACTTCCTGAAGAAGATCATCAAGGAAAAGTTT
176   S S F S E A M R M G S E V Y H F L K K I I K E K F
601   GGTCTTGACTCCACTGCTGTGGGTGATGAAGGTGGATTTGCTCCCAACATCCAGAACAACAAAGATGCTCTTTTC
201   G L D S T A V G D E G G F A P N I Q N N K D A L F
676   CTGATCCAGGATGCCATCCAGCAGGCTGGTTACACTGGCAAGATTGAAATTGGAATGGATGTAGCTGCCTCTGAA
226   L I Q D A I Q Q A G Y T G K I E I G M D V A A S E
751   TTCTTCAAGAATGGCACCTATGACCTTGACTTCAAGAACCCCAAGTCCAACCCTGCTGACTACCTGTCATCTGAG
251   F F K N G T Y D L D F K N P K S N P A D Y L S S E
826   AAGTTAGCTGAGGTGTACCTTGACTTCATCANAGACTTTCCCATGGTATCCATTGAGGATCCCTTCGACCAAGAT
276   K L A E V Y L D F I X D F P M V S I E D P F D Q D
901   GACTGGGCGGCATGGAGTAGCCTCACTTCCCGCACACCCATCCAAATTGTTGGGGATGATCTTACTGTAACAAAC
301   D W A A W S S L T S R T P I Q I V G D D L T V T N
976   CCTAAGCGTATTGCTACCGCCGTCGAGAAGAAAGCTTGCAACTGCTTGCTCTTGAAGGTAAACCAAATTGGCAGT
326   P K R I A T A V E K K A C N C L L L K V N Q I G S
1051  GTCACTGAATCCATTGATGCTCACTTGCTGGCCAAGAAAAATGGATGGGGCACCATGGTTTCCCACAGGTCTGGA
351   V T E S I D A H L L A K K N G W G T M V S H R S G
1126  GAGACTGAAGACACTTTCATTGCTGATCTCGTAGTCGGTTTGTCTACCGGTCAGATCAAGACTGGTGCACCCTGC
376   E T E D T F I A D L V V G L S T G Q I K T G A P C
1201  CGCTCTGAACGTCTTGCCAAGTACAATCAGATCCTCCGCATTGAAGAGGAACTCGGCGCCGCTGCCAAATACGCT
401   R S E R L A K Y N Q I L R I E E E L G A A A K Y A
1276  GGCAAGAACTTCCGCAGGCCTGTTTAA
426   G K N F R R P V *
```

图 1　斜纹夜蛾 6 龄幼虫中肠糖代谢相关基因的 ORF 和氨基酸序列

Fig. 1　The open reading frames and deduced amino acid sequences of genes involved in glycometabolism in the midgut of the 6th instar larvae of *Spodoptera litura*

A：α-L-岩藻糖苷酶基因 Alpha-L-fucoside fucohydrolase gene；B：N-乙酰葡萄糖胺-6-磷酸去乙酰酶基因 N-acetylglucosamine-6-phosphate deacetylase gene；C：烯醇化酶基因 Enolase gene.

要负责将岩藻糖从寡糖、糖蛋白和糖脂的非还原端降解(Intra *et al.*, 2010)。N-乙酰葡萄糖胺-6-磷酸去乙酰酶基因的 ORF 全长 200 bp，编码 399 个氨基酸，预测的分子量为 43.3 kDa(图 1：B)，与蜜蜂 *Apis florea* 的 N-乙酰葡萄糖胺-6-磷酸去乙酰酶基因(GenBank 登录号：XM_003693999)序列一致性最高(91%)。N-乙酰葡萄糖胺-6-磷酸去乙酰酶参与昆虫几丁质的合成(贺玉年等，2009)。烯醇化酶基因的 ORF 全长 1 299 bp，编码 433 个氨基酸，预测的分子量为 46.7 kDa(图 1：C)，编码烯醇化酶，和草地贪夜蛾 *Spodoptera frugiperda*(GenBank 登录号：EU032939)烯醇化酶的基因序列一致性最高(95%)。烯醇化酶是糖酵解途径中一个必需的酶，它可以催化 2-磷酸甘油酸脱水生成磷酸烯醇式丙酮酸。

2.2　不同发育阶段糖酵解相关基因的 mRNA 表达分析

为研究这些糖代谢相关基因在中肠变态发育过程中的表达情况，我们采用半定量 PCR 的方法检测了其在末龄幼虫、预蛹和蛹期的 mRNA 相对水平。结果表明，这些基因的表达情况可以分为 5 种不同的模式：(Ⅰ)只在幼虫期高表达，包括：唾液麦芽糖酶前体蛋白(salivary maltase precursor)、糖基水解酶 31 家族成员蛋白(glycosyl hydrolase family 31 protein)、线粒体乙醛脱氢酶(mitochondrial aldehyde dehydrogenase)和 β-1，3-葡聚糖酶(β-1，3-glucanase)基因(图 2：A)；(Ⅱ)只在预蛹期高表达，包括 β-葡萄糖醛酸酶(β-glucuronidase)和 β-N-乙酰基氨基葡萄糖苷酶 3 (β-N-acetylglucosaminidase 3)基因(图 2：B)；(Ⅲ)只在蛹期高表达，包括葡萄糖胺-6-磷酸异构酶(glucosamine-6-phosphate isomerase)基因(图 2：C)；(Ⅳ)在预蛹期和蛹期均高表达，如 α-葡萄糖苷酶(α-glucosidase)、α-淀粉酶(α-amylase)、N-乙酰葡糖胺-6-磷酸脱乙酰酶(N-acetylglucosamine-6-phosphate deacetylase)和 α-L-岩藻糖苷酶(α-L-fucoside fucohydrolase)基因(图 2：D)；(Ⅴ)在变态发育期恒定表达：烯醇化酶(enolase)基因(图 2：E)。这说明，为适应变态发育斜纹夜蛾中肠糖代谢途径发生了明显的改变。

2.3　对激素诱导的响应

为研究激素对中肠糖代谢相关基因表达的影响，我们选取 6 龄初期的幼虫，分别注射 2 μg 保幼激素(JH)和蜕皮激素(20E)。该剂量激素足以引起斜纹夜蛾激素诱导基因的表达(Gu *et al.*, 2012)。我们从 4 类变态发育期有显著差异表达的基因中分别选取了其中一个作为代表，采用定量 PCR 的方法检测了注射激素对中肠基因的诱导表达情况。结果表明：保幼激素对这些基因的表达没有明显的影响。但蜕皮激素对糖基水解酶 31 家族成员蛋白基因(Ⅰ类基因)具有一定的抑制作用，例如处理 3 h 时，该基因表达量仅为对照的 0.8% ($t=8.41$, $P=0.001$)；对葡萄糖胺-6-磷酸异构酶(Ⅲ类基因)有显著的上调作用，处理 6 h 和 12 h 时的表达量分别为对照的 2.31 ($t=-11.55$, $P=0.01$)和 2.01 倍($t=-5.66$, $P=0.03$)(图 3)。

2.4　对饥饿因素的响应

我们选择了激素处理中所采用的 4 个基因，采用定量 PCR 的方法研究了饥饿对其 mRNA 表达水平的影响。结果表明，饥饿对几乎所有这些基因的表达都有显著的抑制作用。例如，对于糖基水解酶 31 家族成员蛋白基因，其在饥饿处理 48 h 时的表达量仅为对照的 1% ($t=15.58$, $P=0.0001$)(图 4)。

3　讨论

昆虫变态发育过程中，中肠糖代谢相关基因的转录表达发生了显著的改变。斜纹夜蛾中肠组织的 12 个糖代谢相关基因在变态发育期的表达模式可以分为 5 类：(Ⅰ)只在幼虫期高表达，包括：唾液麦芽糖酶前体蛋白、糖基水解酶 31 家族成员蛋白、线粒体乙醛脱氢酶和 β-1，3-葡聚糖酶基因。这些基因的编码产物主要是与葡聚糖、麦芽糖、纤维素等分解相关的酶。很显然，这些基因的高表达与消化食物中的营养物质相关。(Ⅱ)只在预蛹期高表达，包括：β-葡萄糖醛酸酶、β-N-酰基氨基葡萄糖苷酶 3 基因。这类基因的产物主要是几丁质降解相关的酶(Kramer and Muthukrishnan, 2005)。昆虫进入预蛹期，旧的幼虫中肠围食膜开始大量降解。显然，这类基因的高表达主要是负责幼虫中肠围食膜几丁质的降解。(Ⅲ)只在蛹期高表达，如葡萄糖胺-6-磷酸异构酶基因。这个基因的产物是昆虫几丁质合成通路中的关键酶(Kramer and Muthukrishnan, 2005)。葡萄糖胺-6-磷酸异构酶在蛹期的高表达意味着此时蛹表皮的大量合成。(Ⅳ)预蛹期和蛹期高表达，包括：α-葡萄糖苷酶、α-淀粉酶、N-乙酰葡糖胺-6-磷酸脱乙酰酶和 α-L-岩

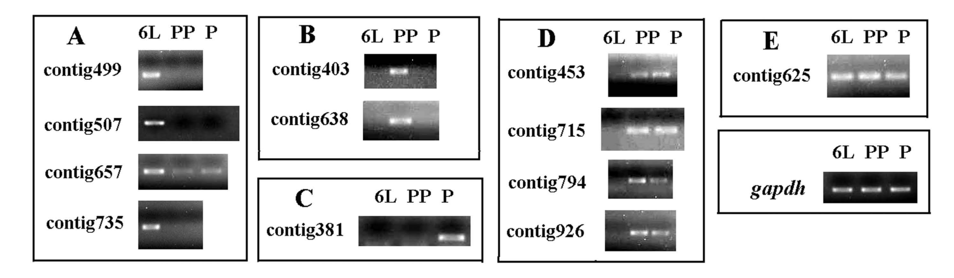


图 2　糖代谢相关基因在斜纹夜蛾变态发育期中肠组织的 mRNA 表达情况

Fig. 2　mRNA profiles of genes involved in glycometabolism in the midgut of *Spodoptera litura* during metamorphosis

这些基因的表达情况可以分为 A ~ E 共 5 种不同的模式。The mRNA expression profiles are divided into five different patterns (A – E). Contig499：唾液麦芽糖酶前体蛋白基因 Salivary maltase precursor gene；Contig507：糖基水解酶 31 家族成员蛋白基因 Glycosyl hydrolase family 31 protein gene；contig657：线粒体乙醛脱氢酶基因 Mitochondrial aldehyde dehydrogenase gene；contig735：β-1,3-葡聚糖酶基因 β-1,3-glucanase gene；contig403：β-葡萄糖醛酸酶基因 β-glucuronidase gene；contig638；β-N-乙酰基氨基葡萄糖苷酶 3 基因 β-N-acetylglucosaminidase 3 gene；contig381：葡萄糖胺-6-磷酸异构酶基因 Glucosamine-6-phosphate isomerase gene；contig453：α-葡萄糖苷酶基因 α-glucosidase gene；contig715：α-淀粉酶基因 α-amylase gene；contig794：N-乙酰葡糖胺-6-磷酸脱乙酰酶基因 N-acetylglucosamine-6-phosphate deacetylase；ontig926：α-L-岩藻糖苷酶基因 α-L-fucoside fucohydrolase gene；ontig625：烯醇化酶基因 Enolase gene. 6L：幼虫 6th instar larva；PP：预蛹 Prepupa；P：蛹 Pupa.

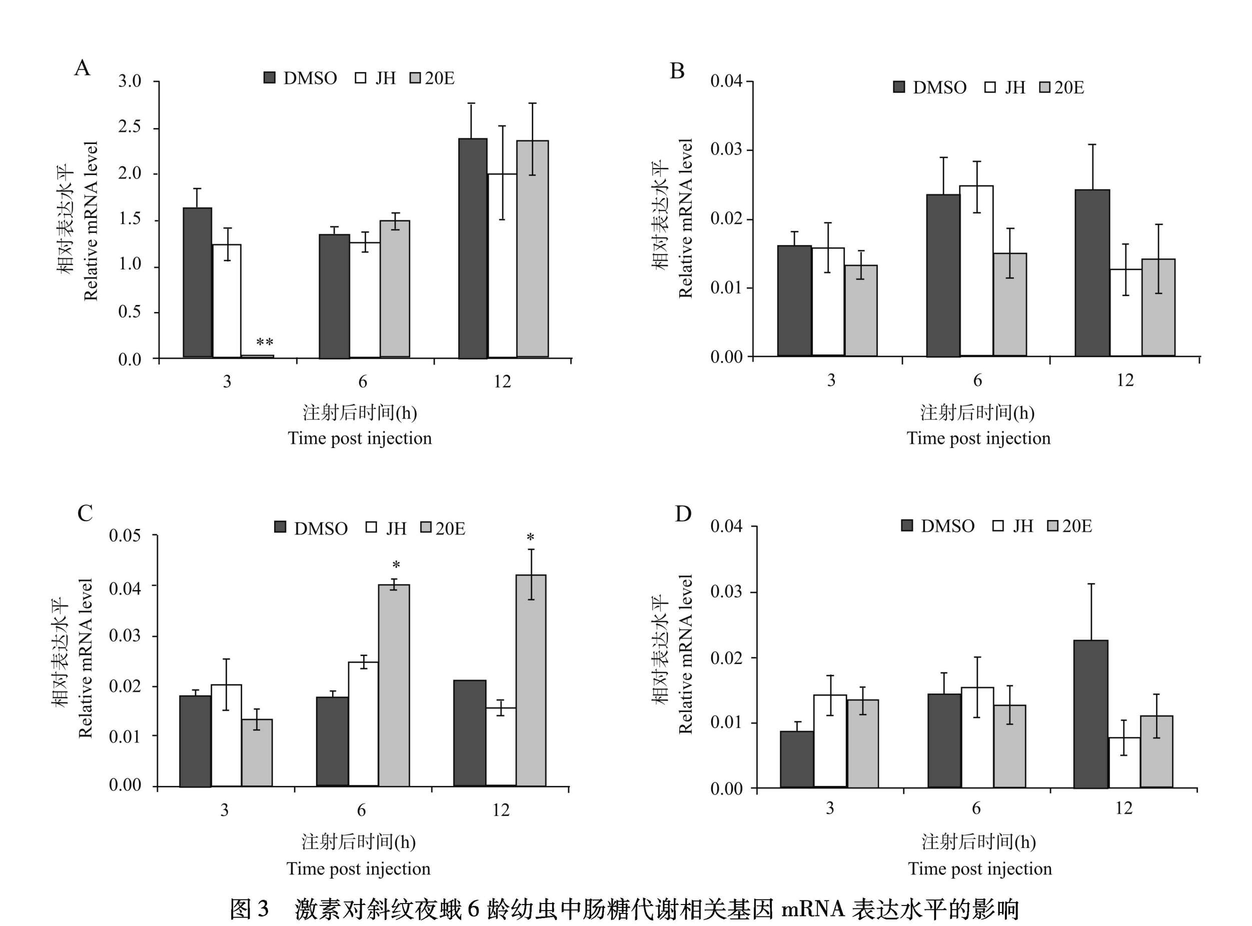


图 3　激素对斜纹夜蛾 6 龄幼虫中肠糖代谢相关基因 mRNA 表达水平的影响

Fig. 3　Effect of hormones on the mRNA expression of genes involved in glycometabolism in the midgut of the 6th instar larvae of *Spodoptera litura*

A：糖基水解酶 31 家族成员蛋白基因 Glycosyl hydrolase family 31 protein gene；B：β-葡萄糖醛酸酶基因 β-glucuronidase gene；C：葡萄糖胺-6-磷酸异构酶基因 Glucosamine-6-phosphate isomerase gene；D：α-淀粉酶基因 α-amylase gene. 图中数据为平均值 ± 标准误；柱上的星号和双星号分别表示 *t* 测验中处理(JH 或 20E)和对照(DMSO)间在 5% 和 1% 水平上的显著差异性。Data in the figure are mean ± *SE*. The significance of difference between a treatment (JH or 20E) and the control (DMSO) at the 5% and 1% level in the *t* test is marked with single and double asteriskd above bars, respectively.

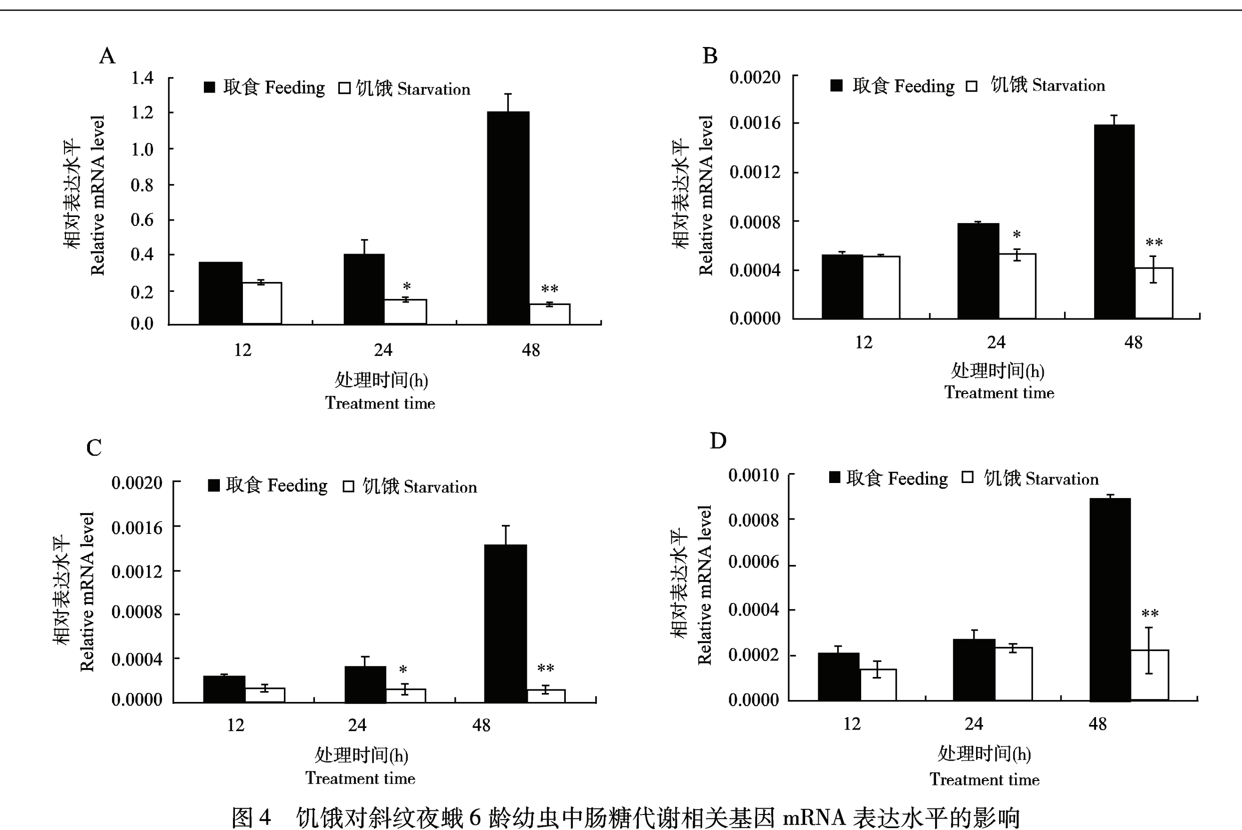


图 4 饥饿对斜纹夜蛾 6 龄幼虫中肠糖代谢相关基因 mRNA 表达水平的影响

Fig. 4 Effect of starvation on the mRNA expression of genes involved in glycometabolism in the midgut of the 6th instar larvae of *Spodoptera litura*

柱上星号和双星号分别表示 *t* 检测中取食与饥饿间在 5% 和 1% 水平上差异显著。The single and double asterisks above bars indicate significant difference between feeding and starvation groups at the 5% and 1% level in the *t* test, respectively.

藻糖苷酶基因。其中 α-葡萄糖苷酶、α-淀粉酶、N-乙酰葡糖胺-6-磷酸脱乙酰酶、α-L-岩藻糖苷酶和 N-乙酰葡糖胺-6-磷酸脱乙酰酶参与几丁质的降解，α-淀粉酶和 α-L-岩藻糖苷酶分别与淀粉和糖原的降解有关。这说明，在整个变态发育期几丁质、淀粉和糖原的降解都十分活跃。（Ⅴ）在变态发育期恒定表达，如烯醇化酶基因。烯醇化酶是糖酵解/糖原异生途径的一种酶。它是一种双向催化酶，可以催化反应向糖酵解和糖原异生作用这两个相反的方向进行。这种酶活性的变化并不影响糖酵解/糖原异生作用。综合以上的分析，我们看出，糖代谢途径在中肠变态发育过程中发生了显著的改变。由于昆虫在变态前后食性完全不同，因此中肠糖代谢相关基因 mRNA 水平的变化可能是为了更好地适应变态后昆虫食性的改变。另外，有研究表明，脂肪体中糖代谢改变会导致中间代谢产物，如葡萄糖和海藻糖的富余，它们可以通过血淋巴进入大脑，影响脑神经肽 PTTH 的合成，从而对昆虫生长发育（滞育）和变态等产生调节作用（Xu *et al*., 2012）。这也意味着，中肠糖代谢的变化有可能反过来影响昆虫的生长发育和变态。

糖代谢受到蜕皮激素的调控。昆虫的生长发育和变态受到两种生长激素 JH 和 20E 的严密控制。蜕皮激素控制着每一龄期间的蜕皮发育，而保幼激素使昆虫保存幼体的形态，阻止变态的发生。在末龄幼虫晚期（预蛹期），保幼激素含量降低，而蜕皮激素高分泌，这诱导一系列转录因子如 EcR，Brc-Z，E74 等的级联反应，使昆虫进入变态发育阶段。糖代谢相关的许多酶都受到蜕皮激素 20E 的调控。这些酶在整个末龄幼虫期都维持一个较高的活性，但进入蛹期后活性大为降低。然而当前胸腺被去除以后，这些代谢酶的活性却一直维持在一个较高的水平，不受变态发育的影响。这些结果表明，来自前胸腺的蜕皮激素可能对这些代谢酶的活性起着一定的抑制作用（Suzuki *et al*., 2011）。在本研究中，我们发现第Ⅰ类基因（主要是葡聚糖、麦芽糖、纤维素等分解相关的酶基因）在幼虫期具有很高的表达，但进入变态发育期后其表达水平急剧降低到几乎检测不到的水平。进一步的研究发现，20E 对这类基因具有显著的抑制作用。此外，我们还发现第

Ⅲ类基因(如葡萄糖胺-6-磷酸异构酶以及几丁质合成途径的关键酶基因)在蛹期高表达，而这类基因受到 20E 的诱导而明显上调。这意味着昆虫进入蛹期，随着 20E 浓度的增加，从而诱导葡萄糖胺-6-磷酸异构酶的大量表达。这也意味着蛹期几丁质的合成也是受 20E 调控的。尽管在很多情况下，JH 对 20E 的诱导起着一定的拮抗作用，但在本研究中所涉及的糖代谢相关基因却不受 JH 的影响。这说明，变态发育过程中糖代谢主要通过 20E 而受到严密的调控。

除激素外，饥饿也是调节糖代谢的重要因素。饥饿通常能对糖代谢产生重要的影响。例如，家蚕幼虫中肠的 β-葡萄糖苷酶在饲养期有高水平的表达，而在饥饿条件下其表达水平明显下调(Byeon *et al*., 2005)。进入变态发育期昆虫除了体内 JH 和 20E 两种激素的浓度发生变化外，长期不进食也可能诱导昆虫进入一种饥饿状态。本研究发现，饥饿对几乎所有的糖代谢相关基因均产生非常显著的抑制作用。取食通常诱导胰岛素的大量分泌，而饥饿则抑制胰岛素的分泌(Hedeskov and Capito, 1974)。因此，饥饿对糖代谢的抑制有可能是通过抑制胰岛素的分泌而起作用。

从以上的分析可以看出昆虫进入变态发育期，不仅 20E 的浓度发生了显著的变化，变态发育期的不进食状态还很可能抑制胰岛素的分泌。因此，20E 和胰岛素可能是影响变态发育期昆虫中肠糖代谢的两个关键因素，两者共同影响着昆虫中肠的变态发育过程。

参考文献(References)

Byeon GM, Lee KS, Gui ZZ, Kim I, Kang PD, Lee SM, Sohn HD, Jin BR, 2005. A digestive beta-glucosidase from the silkworm, *Bombyx mori*: cDNA cloning, expression and enzymatic characterization. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol*., 141: 418–427.

Gu J, Huang LX, Shen Y, Huang LH, Feng QL, 2012. Hsp70 and small Hsps are the major heat shock protein members involved in midgut metamorphosis in the common cutworm, *Spodoptera litura*. *Insect Mol. Biol*., 21(5): 535–543.

Guo XR, Zheng SC, Liu L, Feng QL, 2009. The sterol carrier protein 2/3-oxoacyl-CoA thiolase (SCPx) is involved in cholesterol uptake in the midgut of *Spodoptera litura*: gene cloning, expression, localization and functional analyses. *BMC Mol. Biol*., 10: 102.

He WY, Rao ZC, Zhou DH, Zheng SC, Xu WH, Feng QL, 2012. Analysis of expressed sequence tags and characterization of a novel gene, *Slmg7*, in the midgut of the common cutworm, *Spodoptera litura*. *PLoS ONE*, 7: e33621.

Hedeskov CJ, Capito K, 1974. The effect of starvation on insulin secretion and glucose metabolism in mouse pancreatic islets. *Biochem J*., 140(3): 423–433.

Hu GD, 2003. Life activity and management of *Spodoptera litura*. *Anhui Agriculture*, (8): 20. [胡国栋, 2003. 斜纹夜蛾生活习性及防治. 安徽农业, (8): 20]

Intra J, Perotti ME, Pasini ME, 2011. Cloning, sequence identification and expression profile analysis of α-L-fucosidase gene from the Mediterranean fruit fly *Ceratitis capitata*. *J. Insect Physiol*., 57: 452–461.

Kramer KJ, Muthukrishnan S, 2005. Chitin metabolism in insects. In: Gilbert LI, Iatrou K, Gill SS eds. Comprehensive Molecular Insect Science. Elsevier, Oxford. 111–144.

Liu Y, Liu H, Liu S, Wang S, Jiang RJ, Li S, 2009. Hormonal and nutritional regulation of insect fat body development and function. *Arch. Insect Biochem. Physiol*., 71: 16–30.

Liu JC, Zheng SC, Liu L, Feng QL, 2010. Protein profiles of the midgut of *Spodoptera litura* larvae at the sixth instar feeding stage by shotgun ESI-MS approach. *J. Proteome Res*., 9: 2117–2147.

Livak KJ, Schmittgen TD, 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) method. *Methods*, 25: 402–408.

Lv SL, Zang RC, Xu JL, 1994. Effect of fluoride poisoning on regulation of glycogen catabolism in larval midguts of silkworm, *Bombyx mori*. *Science of Sericulture*, 20(2): 110–114. [吕顺霖, 藏荣春, 徐俊良, 1994. 氟中毒对家蚕幼虫中肠组织糖原分解代谢调节的影响. 蚕业科学, 20(2): 110–114]

Shao YY, Huang GD, Li W, Liu SZ, Ai JQ, 1995. The role of FDP on the glycometabolism. *Journal of Hubei Institute of Technology*, 10(2): 23–27. [邵友元, 黄光斗, 李卫, 刘胜珍, 艾金群, 1995. FDP 对糖代谢的调控作用. 湖北工学院学报, 10(2): 23–27]

Steele JE, 1961. Occurrence of a hyperglycemic factor in the *Corpus cardiacum* of an insect. *Nature*, 192: 680–681.

Suzuki T, Sakurai S, Iwami M, 2011. Steroidal regulation of hydrolyzing activity of the dietary carbohydrates in the silkworm, *Bombyx mori*. *J. Insect Physiol*., 57: 1282–1289.

Tian L, Guo E, Wang S, Liu S, Jiang RJ, Cao Y, Ling E, Li S, 2010. Developmental regulation of glycolysis by 20-hydroxyecdysone and juvenile hormone in fat body tissues of the silkworm, *Bombyx mori*. *J. Mol. Cell Biol*., 2: 255–263.

White KP, Rifkin SA, Hurban P, Hogness DS, 1999. Microarray analysis of *Drosophila* development during metamorphosis. *Science*, 286: 2179–2184.

Xu WH, Lu YX, Denlinger DL, 2012. Cross-talk between the fat body and brain regulates insect developmental arrest. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 109: 14687–14692.

Yao WH, 2005. Biological characteristics of *Spodoptera litura*. *Entomological Journal of East China*, 14(2): 122–127. [姚文辉, 2005. 斜纹夜蛾的生物学特性. 华东昆虫学报, 14(2): 122–127]

(责任编辑：赵利辉)